

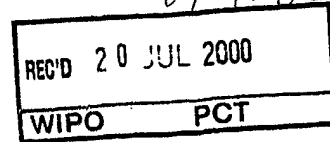
PCT/DE 00/01444

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 00/1444

09-979,513

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 199 22 052.2

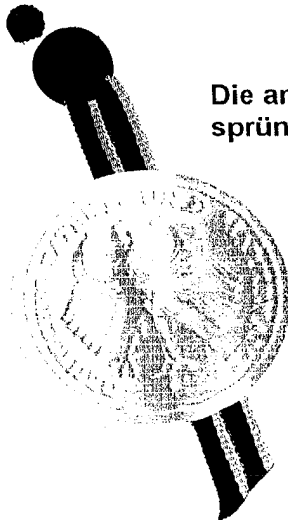
**Anmeldetag:** 14. Mai 1999

**Anmelder/Inhaber:** Theragen Molekularmedizinische  
Informationssysteme AG,  
Berlin/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zum Nachweis der Wirkung von unter-  
schiedlichen Chemotherapeutika und/oder einer  
Strahlentherapie bei malignen Erkrankungen sowie  
Verfahren zur Auswahl wirkungsvoller therapeu-  
tischer Mittel zu deren Therapie

**IPC:** C 12 Q, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.



München, den 23. Juni 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

HOB



**Verfahren zum Nachweis der Wirkung von unterschiedlichen Chemotherapeutika und/oder einer Strahlentherapie bei malignen Erkrankungen sowie Verfahren zur Auswahl wirkungsvoller therapeutischer Mittel zu deren Therapie**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis der Wirkung von unterschiedlichen Chemotherapeutika und/oder einer Strahlentherapie bei malignen Erkrankungen, wobei die Expressionsprofile von Tumor- und/oder Zellwachstums- und/oder Apoptose-assoziierten Genen und/oder die individuellen Unterschiede (Mutationen) in den Gen-Sequenzen bestimmt werden. Veränderungen im Zusammenhang mit Chemotherapeutika und/oder Strahlentherapie werden identifiziert, dargestellt und diagnostisch bewertet. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Auswahl wirkungsvoller therapeutischer Mittel zur Therapie maligner Erkrankungen. Es wird der Status von Zellzyklusgenen und/oder von Apoptose-assoziierten Targetgenen bzw. von deren Genprodukten in Körperflüssigkeiten, Zellen und/oder Organen bestimmt und hinsichtlich ihrer Wirkung auf entsprechende therapeutische Mittel diagnostisch ausgewertet. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Bax- und p53-Expression bzw. Mutationen untersucht und daraus abgeleitet Aussagen zur individualspezifischen Therapie-Entscheidung bei leukämischen Erkrankungen und anderen tumoralen Erkrankungen bereitgestellt.

Der Prozess einer malignen Veränderung einer Zelle beginnt sehr frühzeitig, oft mit nur einer einzigen Veränderung im genetischen Material. Es verläuft über verschiedene Stadien bis hin zur entarteten Zelle und ist selbst zu diesem Stadium noch nicht beendet.

Fortschritte der modernen Molekularbiologie, einhergehend mit einem besseren Verständnis über die Entstehung bösartiger Veränderungen auf molekularer Ebene, erbrachten eine Vielzahl neuer Informationen über im Prozess der Kanzerogenese und Tumorprogression beteiligte Faktoren. Allerdings zeigen diese Ergebnisse auch deutlich, wie vielgestaltig, different und komplex Veränderungen im molekularen Netzwerk sind, um sich letztlich in einem malignen Phänotyp bzw. therapieresistenten Tumor zu präsentieren. Die Beteiligung verschiedener Faktoren im Prozess einer Tumorentwicklung sind einerseits Ausdruck der Kompliziertheit eines solchen Prozesses, können aber auch für eine diagnostische Anwendung sowie prognostische Risikoabschätzung genutzt werden.

Trotz des bis zum heutigen Zeitpunkt erreichten Erkenntnisstandes, erfolgt die Stadieneinteilung und darauf basierend die Behandlung von Tumorpatienten nach wie vor nach histopathologischen bzw. klinischen Kriterien. Diese konventionelle Klassifikation ist somit auch nach wie vor maßgebend für alle Therapieentscheidungen (Hämatologie Onkologie, Hrsg. P.C. Ostendorf und S. Seeber, Urban und Schwarzenberg 1997;

Kompodium Internistische Onkologie. Hrsg. H.J. Schmoll, K. Höffken, K. Possinger, Springer 1997).

Eine individualspezifische Therapierung auf der Basis einer möglichst umfassenden molekularen Charakterisierung des Tumors konnte bisher nicht durchgeführt werden.

Der Erfindung hatte deshalb die Aufgabe, Erkenntnisse auf molekularer Ebene für eine individualspezifische Tumorthherapie einzusetzen und für die betroffenen Patienten eine wirkungsvolle Auswahl an therapeutischen Mitteln zu finden um eine effektive Behandlung zu ermöglichen.

Tumorentstehung, Tumorprogression und Therapieresistenz werden durch Zellzyklus- und Apoptose-regulierende Faktoren bestimmt. Grundlage der vorliegenden Erfindung war die überraschende Erkenntnis, daß man durch Bestimmung ihres Expressionsprofils diese Tumor- bzw. Zellwachstum-assoziierten Gene als prognostische Marker nutzen und das Ansprechen des Patienten auf unterschiedliche Chemotherapeutika, Strahlentherapie sowie klinische Parameter korrelieren kann. Daraus kann in Abhängigkeit vom bestehenden Markerprofil eine effektive und erfolversprechende Therapieform für den Patienten abgeleitet werden.

Die Erfindung betrifft deshalb ein Verfahren zum Nachweis der Wirkung von unterschiedlichen Chemotherapeutika und/oder einer Strahlentherapie bei malignen Erkrankungen. Erfindungsgemäß werden die Expressionsprofile von Tumor- und/oder Zellwachstum-assoziierten Genen und/oder die individuellen Unterschiede (Mutationen) in den Gen-Sequenzen bestimmt und Wechselwirkungen (Zusammenhänge) mit Chemotherapeutika und/oder Strahlentherapie identifiziert, dargestellt und diagnostisch bewertet.

Es wurde festgestellt, daß die Störung der Apoptose zusammen mit der Deregulation des Zellzyklus ein entscheidender Mechanismus bei Entstehung, Wachstum und der Progression maligner Tumoren ist. Die Rekonstitution der Fähigkeit zum Zellzyklus-Arrest und von apoptosefördernden Genen ist bereits ein wichtiges Ziel experimenteller gentherapeutischer Strategien. Es wurde gefunden, daß eine Hemmung von Apoptose-Signalkaskaden zu Resistenz gegen Zytostatika- und Strahlen-Therapie führen kann, die vor allem bei soliden Tumoren von enormer klinischer Bedeutung ist. Diese Resistenzmechanismen können durch Störungen der Apoptose und des Zellzyklus dadurch entstehen, daß in spezifischen Genen und deren Genprodukten pathologisch relevante Veränderungen enthalten sind. Wichtige Tumorgene, die für Resistenzmechanismen verantwortlich sind, sind z.B. die Gene der bcl-2-

Familie, vzw. Bax, p53, p16, Caspasen, Rb, Zykline, Inhibitoren von Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK's), ATM und Inhibitoren von Apoptose-Proteinen (IAPs).

Bevorzugt werden gemäß der Erfindung die Expressionsprofile und/oder Mutationen von den genannten Genen mittels Protein- oder DNA/RNA-Analytik bestimmt. Es werden dabei die Expressionsprofile und/oder Mutationen von den jeweiligen einzelnen Genen ausgewertet. Es können aber auch die Profile und/oder Mutationen verschiedener Gene kombiniert werden, wodurch das Erstellen individueller Therapieschema verbessert und eine individuelle Prognose und Risikoabschätzung möglich wird. Vorzugsweise werden die Expressionsprofile von Bax-, p53-, p16-, Caspasen- und/oder Rb- Genen oder ihre Mutationen genutzt und diagnostisch ausgewertet. Besonders bevorzugt wird der Status von p53-Genen und von Bax-Genen bzw. von deren Genprodukten identifiziert.

Gegenstand der Erfindung ist insbesondere ein Verfahren zur Auswahl wirkungsvoller therapeutischer Mittel zur Therapie maligner Erkrankungen. Es ist gekennzeichnet durch Bestimmung des Status von Zellzyklusgenen und/oder von Apoptose-assoziierten Targetgenen bzw. von deren Genprodukten ex vivo in Körperflüssigkeiten, Zellen und Organen, der in Zusammenhang mit der Wirkung entsprechender therapeutischer Mittel diagnostisch ausgewertet wird.

Therapeutische Mittel im Sinne der Erfindung sind an sich bekannte Mittel für die Therapie von leukämischen bzw. Lymphom-Erkrankungen und von anderen malignen Erkrankungen, wie z.B. von Tumoren des Gastrointestinaltraktes, des Pankreas, der Prostata, von gynäkologischen Tumoren (wie z.B. Ovar, Zervix, Mamma), Sarkomen, Hirntumoren, Tumoren der Haut und der Lunge sowie Tumoren endokriner Organe, wie z.B. der Schilddrüse u.a.

Es handelt sich um an sich bekannte Zytostatika, vorzugsweise um Steroidhormone (z. B. Prednison, Prednisolon, Methylprednisolon, und andere Glukocorticoide), Antimetaboliten (Cladribin (2-CDA), Fludarabin, Mercaptopurin, Arabinosid C, 5-substituierte Didesoxynukleoside, wie 5-Fluoruracil, Azidothymidin), um Alkylantien (z.B. Mafosfamid, Chlorambucil, Melphalan, Cyclophosphamid), Taxane (wie Paclitaxel, Docetaxel), Anthrazykline (z.B. Idarubicin, Doxorubicin, Epirubicin, Mitoxanthron), Topo-Isomerase-Inhibitoren (wie Etoposid), Vinca-Alkaloide, (Vincristin, Vinblastin, Vinorelbin), cis-Platin und andere Platinanaloga u. v. a. m. sowie um Strahlentherapie.

Die Erfindung soll im folgenden am Beispiel von leukämischen Erkrankungen weiter erläutert werden. So wurde festgestellt, daß bevorzugt zur Therapie von chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), unter Auswertung der Bax-Expression oder Mutationen bei Bax-

Expressionsverlust eine Therapie mit Alkylantien, Anthrazyklinen und Vinca-Alkaloiden weitaus weniger wirksam ist. Eine solche Therapie sollte daher vermieden werden und anderen Therapieformen der Vorzug gegeben werden. Die der Erfindung zu Grunde liegenden Daten beweisen eindeutig, daß bei Patienten mit CLL bei einer niedrigen Bax-Expression ein sehr schlechtes Ansprechen auf eine Zytostatika-Therapie *in vitro* gegenüber den Alkylantien Malosfamid, Chlorambucil, Melphalan, gegenüber den Anthrazyklinen Doxorubicin, Epirubicin sowie gegen das Vinca-Alkaloid Vincristin vorliegt. Diese *in vitro* Sensitivitätsdaten korrelieren mit dem Ansprechen auf Therapie *in vivo*.

Andererseits konnte gezeigt werden, daß zur Therapie von leukämischen Erkrankungen, vorzugsweise von CLL, bei niedriger Bax-Expression eine *in vitro* Therapie mit Steroidhormonen oder Fludarabin erfolgversprechend ist. Es gibt nämlich keinen Einfluß auf die Ansprechbarkeit gegenüber Steroidhormonen, z.B. Prednisolon und Methylprednisolon oder gegenüber Fludarabin.

Diese *in vitro* Daten zur Chemoempfindlichkeit der CLL-Zellen zeigen eine gute Korrelation mit dem klinischen Ansprechen der Patienten auf die Substanzen *in vivo*.

Sie belegen ferner, daß die diagnostische Abklärung des Bax-Status wesentlich für eine Therapieentscheidung ist. Da der Expressionsverlust von Bax auf unterschiedlichen Stufen der Realisierung der genetischen Information erfolgen kann, müssen für eine solche Diagnostik auch verschiedene Nachweisverfahren einbezogen werden. Dies betrifft z.B. den Nachweis mutativer Veränderungen auf Ebene der DNA (z.B. Punktmutationen; Frameshift Mutationen) und den Nachweis von Hypermethylierungsmustern innerhalb der Bax-Promoterregion als mögliche Ursache für ein transkriptionelles Silencing und Untersuchungen der Expression- bzw. Expressionshöhe des Bax-Proteins (Immunohistochemie oder Western Blot oder Durchflußzytometrie oder andere quantitative Nachweisverfahren) sowie die Analyse transkriptioneller und translationaler Regulation und des Proteinabbaus.

Unter Auswertung der p53-Expression oder von Mutationen des p53-Gens hat sich gezeigt, daß zur Therapie von leukämischen Erkrankungen, vorzugsweise von CLL, bei Vorliegen von Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenzabschnitte des p53-Gens, eine Therapie mit DNA-schädigenden Substanzen, insbesondere mit Alkylantien, Anthrazyklinen und mit Fludarabin, zu vermeiden ist. Bezüglich einer positiven Korrelation von Mutationen des Tumorsuppressorproteins p53 und einem differentiellen Ansprechen auf Zytostatika konnte nachgewiesen werden, daß für Patienten mit Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenzabschnitte des p53-Genes ein signifikant schlechteres Ansprechen auf Fludarabin und auf DNA-schädigende Substanzen wie z.B. Alkylantien besteht. Auch für das Kandidatengen p53 muß deshalb eine umfassende diagnostische Analytik auf DNA und Proteinebene

durchgeführt werden. Das gilt prinzipiell auch für die p53-homologen Kandidatengene p73 und p41.

Letztlich kann schon über die kombinierte Diagnostik der beiden Kandidatengene p53 und Bax eine individualisierte Therapieform appliziert werden, indem man durch Kombination des genetischen Status des p53- und Bax-Gens bzw. von deren Genprodukten und/oder Mutationen individuelle Therapieschemata erstellt.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Statusbestimmung von Zellzyklusgenen und/oder von Apoptose-assoziierten Targetgenen bzw. von deren Genprodukten oder Mutationen mittels Protein- oder DNA/RNA-Analytik zur Bestimmung von Therapieresistenz und zur gezielten Auswahl therapeutischer Mittel für zytotoxische Therapien. Bevorzugt erfolgt die Analyse anhand von Bax-Expression oder Mutationen oder anhand von p53-Expression oder Mutationen.

Besonders bevorzugt erfolgt die Verwendung der Statusbestimmung von Bax- und p53-Genen für eine risikoadaptierte Tumorthherapie bei leukämischen Erkrankungen, wie der CLL und anderen Tumoren. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Verwendung in Kombination von p53 und Bax mit weiteren Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren, die auch entweder allein oder in ihrer Kombination als eine molekulare Pathway-(Signalweg-) Diagnostik bei malignen Tumoren oder Präkanzerosen eingesetzt werden können.

Es ist zwar bekannt, daß z.B. auf Grund einer bestehenden klaren Funktionalität des Tumorsuppressorproteins p53 innerhalb der Zellzyklus- und Apoptoseregulation ein Verlust von p53-Funktion häufig in Tumoren z.B. durch Mutation, Deletion oder Promotorveränderungen gefunden wird. Überraschend war jedoch, daß ein funktional geschädigtes p53-Protein dennoch ein selektives Ansprechen auf bestimmte Zytostatika bei Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) ermöglicht. Das konnte erstmalig nachgewiesen werden. Dies betrifft darüber hinaus auch eine Vielzahl weiterer apoptoseassoziiierter Targetgene und besonders deren funktionelle Kombination.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden exemplarisch für das Tumorsuppressorprotein p53 und das proapoptotische Gen Bax bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) durchgeführt. Weitere Daten liegen z. B. auch für diese und andere Apoptose- und Zellzyklus-Regulatoren vor bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes, wie z.B. Magenkarzinom, Ösophagus-Karzinom und Sarkomen.

Mit der vorliegenden Erfindung konnte anhand der beiden apoptosebeeinflussenden Proteine p53 und Bax der schlüssige Nachweis dafür erbracht werden, daß über eine diagnostische

Charakterisierung von entsprechenden Tumorgenen auf molekularer Ebene (DNA) und auf Expressionsebene (Protein) die Möglichkeit besteht, Zytostatika selektiv auszuwählen, um somit eine verbesserte Behandlung zu erreichen. Die Erkenntnisse zur molekularen Pathogenese und Therapieresistenz von Tumoren können erfindungsgemäß als Grundlage für eine individualspezifische Tumorthherapie eingesetzt werden und auf diesem Wege eine gezieltere und letztlich für den betroffenen Patienten auch maximal erfolgreiche Behandlung erwirken.

Somit kann man Patienten, die nach molekularen Maßstäben eine per se gute Prognose haben, auf zytotoxische Therapien anzusprechen und ein besseres Überleben nach Therapie zeigen, aufwendige und kostenintensive Therapien ersparen. Gleichzeitig können bei Patienten mit schlechtem Risikoprofil aggressivere Behandlungen durchgeführt werden, um den Therapieeffekt zu verbessern. Weiterhin können bei nachgewiesener Resistenz durch eine weniger aggressive Behandlung unnötige Belastungen für den Patienten und Kosten vermieden werden.

Durch die Erfindung ist es möglich, veränderte zelluläre Tumormarker als Entscheidungskriterium für die Auswahl verschiedener Standard-Chemotherapeutika einzusetzen, d.h. auch positive Korrelationen zwischen veränderten Tumormarkern und der Wirksamkeit bzw. auch Unwirksamkeit von Chemotherapeutika auszunutzen. Dies bietet die Möglichkeit, erstmalig nach einer Charakterisierung von ausgewählten zellulären Tumormarkern selektiv die Form des einzusetzenden Chemotherapeutikums bzw. auch einer Strahlentherapie oder deren Kombination auszuwählen.

Aus der folgenden Tabelle 1 kann aufgrund vergleichender Untersuchungen der Expression von Bax-Protein, das als proapoptotisch bei CLL bekannt ist, und dem Bcl-2-Protein, welches an sich die Aufgabe hat, den Zelltod zu blockieren, die Wirkung verschiedener Zytostatika bei einer CLL-Behandlung entnommen werden. So ist eindeutig ersichtlich, daß das Ansprechen auf Anthrazykline und Alkylantien (Doxorubicin, Epirubicin, Chlorambucil und Mafosfamid) sowie Vincristin eine gute Korrelation zum Bax-Expressionsniveau (Western-Blot) zeigt (p-Wert signifikant und  $< 0,05$ ). Keine Korrelation wurde hingegen bei Bestimmung der Bcl-2-Expression gefunden. Hingegen zeigt die Wirkung von Steroidhormonen (Methylprednisolon, Prednisolon) bzw. von Fludarabin-Gabe keine Korrelation zum Niveau der Bax-Expression, woraus auf eine erhöhte zytotoxische Wirkung der eingesetzten Mittel auch bei Bax-negativen Tumorzellen geschlossen werden kann.

Bestätigt werden diese Aussagen durch die in Abbildung 1 dargestellte Korrelation von Bax und der ex-vivo Antwort von CLL-Patienten auf ein Panel von Zytostatika. Angegeben sind

jeweils die relativen Spiegel der Bax-Proteinexpression (densitometrische Werte von Western-Blot-Analysen) und die LC90-Dosis für das jeweilige Zytostatikum.

In Abbildung 2 ist die Korrelation zwischen Bax-Expression mit der LC90 Dosis von Doxorubicin bei 37 CLL-Patienten beschrieben.

Abbildung 3 zeigt die verminderte Zytostatika-Sensivität von CLL-Zellen in vitro gegen die Alkylantien Chlorambucil und Melphalan sowie gegen Fludarabin bei p53-mutierten CLL-Patienten im Vergleich zum p53 Wildtyp. Die p53-Mutationen wurden mittels SSCP-PCR für die Exons 5 bis 8 bestimmt. Die Balkenhöhe entspricht der Dosis des Zytostatikums in µg/ml.



#9

**Anlage 6**

Tabelle 1: Beziehung zwischen dem Niveau der Proteinexpression von Bax, Bcl-2 und dem Verhältnis der Bax und Bcl-2 Expression (Bcl-2/Bax) und der ex-vivo Zytotoxizität von Zytostatika bei der Behandlung der CLL.

Signifikanz-Niveau des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (p-Wert)

Zytostatikum	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
Fludarabin-Phosphat	0.816	0.212	0.829
Cladribine (2-CDA)	0.524	0.351	0.658
Chlorambucil	0.034	0.739	0.157
Mafosfamide	0.017	0.250	0.160
Methylprednisolone	0.836	0.415	0.880
Prednisolone	0.807	0.545	0.898
Vincristine	0.011	0.052	0.127
Doxorubicin	0.001	0.920	0.001
Epirubicin	0.002	0.647	0.001

P-Werte kleiner als 0.05 sind statistisch signifikant

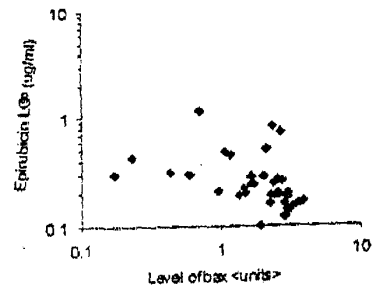
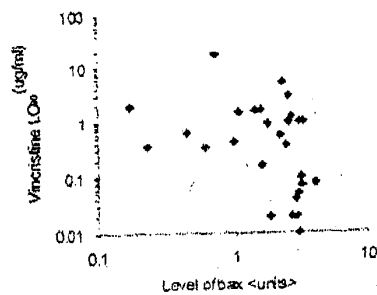
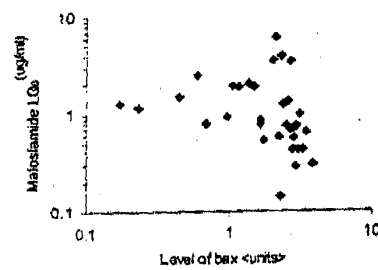
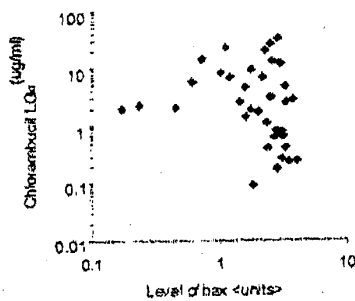
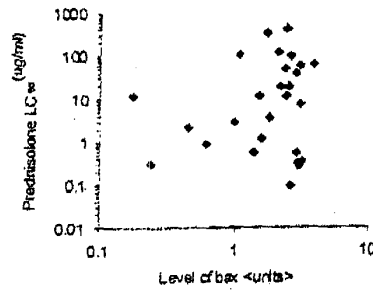
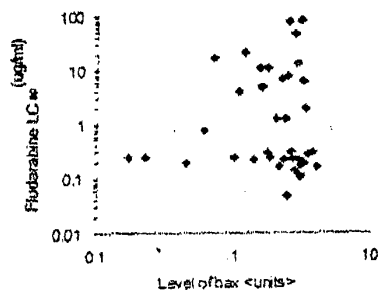
**Patentansprüche:**

1. Verfahren zum Nachweis der Wirkung von unterschiedlichen Chemotherapeutika und/oder einer Strahlentherapie bei malignen Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Expressionsprofile von Apoptose- und/oder Zellwachstum-regulierenden Genen und/oder die individuellen Unterschiede (Mutationen) in den Gen-Sequenzen bestimmt und Veränderungen im Zusammenhang mit Chemotherapeutika und/oder Strahlentherapie identifiziert, dargestellt und diagnostisch bewertet werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Expressionsprofile der Gene der bcl-2-Familie, vzw. Bax, p53, p16, Caspasen, Rb, Zyklinen, Inhibitoren von Zylin-abhängigen Kinasen (CDK's), ATM und Inhibitoren von Apoptose-Proteinen (IAPs) und/oder Mutationen in den Genen mittels Protein- oder DNA/RNA-Analytik bestimmt werden und einzeln oder in verschiedenen Kombinationen bewertet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß individuelle Unterschiede in der Sequenz von Apoptose und/oder Zellwachstum-regulierenden Genen und/oder der Expression ihrer Genprodukte, die bei malignen Erkrankungen vorkommen, in Bezug zu einer individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf Arzneimittel gesetzt und bewertet werden, insbesondere im Hinblick auf ihre Relevanz für Therapie-Ansprechen.
4. Verfahren zur Auswahl wirkungsvoller therapeutischer Mittel zur Therapie maligner Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß der Status von Zellzyklusgenen und/oder von Apoptose-assoziierten Targetgenen bzw. von deren Genprodukten in Körperflüssigkeiten, Zellen und/oder Organen ex vivo bestimmt und die für diesen Status wirkungsvollen therapeutischen Mittel ausgewählt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß Mittel für die Therapie von leukämischen Erkrankungen und anderen hämatologischen Malignomen und soliden Tumoren, wie z.B. Tumoren des Gastrointestinaltraktes, des Pankreas, der Prostata, von gynäkologischen Tumoren, Sarkomen, Hirntumoren, Tumoren der Haut und der Lunge sowie Tumoren endokriner Organe bewertet werden.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß therapeutische Mittel an sich bekannte Zytostatika, vorzugsweise Steroidhormone, Alkylantien, Anthrazykline, Antimetabolite, Taxane, Topo-Isomerase-Inhibitoren, Vinca-Alkaloide, cis-Platin und andere Platin-Derivate u. v. a. m. sind.

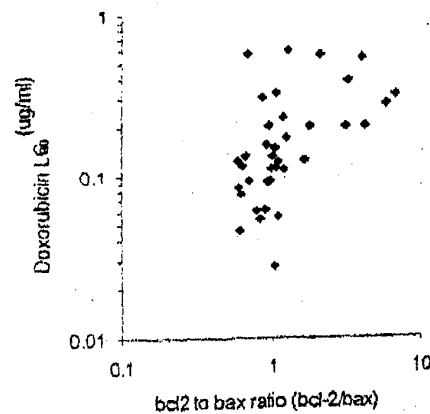
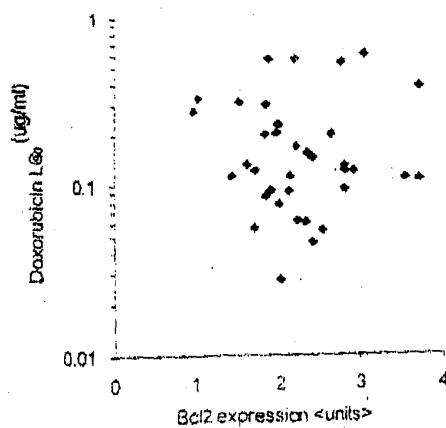
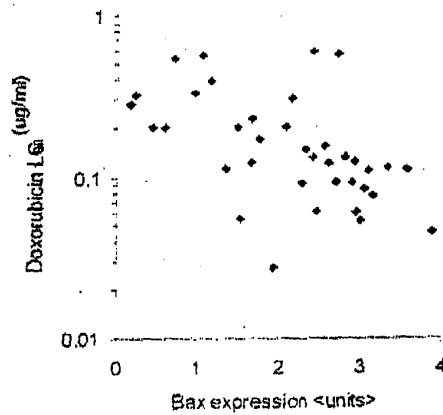
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Therapie von soliden Tumoren bzw. leukämischen und anderen hämatologischen, malignen Erkrankungen, vorzugsweise von chronischer lymphatischer Leukämie, die Bax-Expression oder Mutationen ausgewertet werden und bei niedriger Bax-Expression eine Therapie mit Alkylantien, Anthrazyklinen und Vinca-Alkaloiden vermieden und eine andere Therapieform gewählt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Therapie von leukämischen Erkrankungen, vorzugsweise von chronischer lymphatischer Leukämie, die Bax-Expression oder Mutationen ausgewertet wird und bei niedriger Bax-Expression eine Therapie mit Steroidhormonen oder Fludarabin-phosphat/2-CDA erfolgt.
9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zur Therapie von leukämischen Erkrankungen, vorzugsweise von chronischer lymphatischer Leukämie, die p53-Expression oder Mutationen ausgewertet werden und bei Vorliegen von Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenzabschnitte des p53-Genes eine Therapie mit DNA-schädigenden Substanzen, insbesondere mit Alkylantien, Anthrazyklinen und Fludarabin, vermieden wird und eine andere Therapieform gewählt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß durch Kombination der Bestimmung des Status verschiedener Apoptose- und/oder Zellwachstum-assoziierten Gene, vorzugsweise von p53 und Bax bzw. von deren Genprodukten und/oder Mutationen und/oder deren Homologen individuelle Therapieschemata erstellt werden.
11. Verwendung der Statusbestimmung mittels Protein-oder DNA/RNA-Analytik von Apoptose- und/oder Zellwachstum-assoziierten Genen bzw. von deren Genprodukten zur Ermittlung von Resistenzen gegen Strahlentherapie und gegenüber therapeutischen Mitteln sowie zur gezielten Auswahl therapeutischer Mittel für zytotoxische Therapien.
12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Status, nämlich Expressionsprofil und/oder Mutationen, von Genen der bcl-2-Familie, vzw. Bax, p53, p16, Caspasen, Rb, Zykline, Inhibitoren zyklin-abhängiger Kinasen (CDK's), ATM und Inhibitoren von Apoptose-Proteinen (IAPs) einzelner Gene oder in verschiedenen Kombinationen bestimmt wird.
13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Status von Bax-Expression oder Mutationen des Bax-Gens bzw. Bax-Promotors und Bax-Regulatoren verwendet wird.

14. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Status von p53-Expression oder Mutationen des p53-Gens verwendet wird.
15. Verwendung nach Anspruch 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß Status von Bax und p53 für risikoadaptierte Tumorthapien bei maligne hämatologische Erkrankungen, wie der CLL, und anderen tumoralen Erkrankungen verwendet wird.
16. Verwendung nach Anspruch 12 bis 15 einer Kombination von p53 und Bax sowie ggf. weiterer Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren entweder allein oder in ihrer Kombination im Sinne einer molekularen Pathway-Diagnostik bei malignen Tumoren oder Präkanzerosen.

Abbildung 1: Assoziation der Spiegel von Bax und der ex-vivo Antwort von CLL-Patienten auf ein Panel von Zytostatika. Angegeben sind jeweils die relativen Spiegel der Bax-Proteinexpression (Densitometrische Werte von Western-Blot-Analysen) und die LC90-Dosis für das jeweilige Zytostatikum.

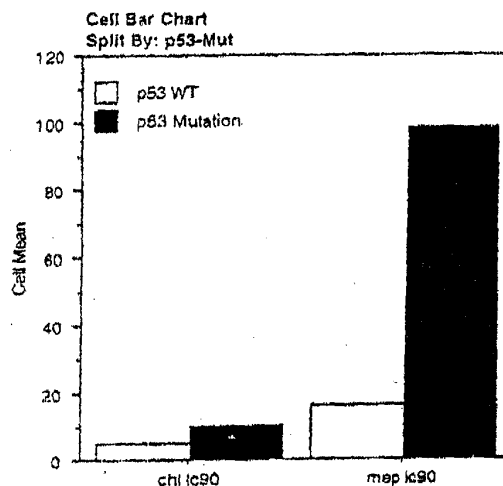


**Abbildung 2:** Assoziation zwischen Bax Expression mit der LC90 Dosis von Doxorubizin bei 37 CLL-Patienten. Dieser Bezug in Hinblick auf die zytotoxische Wirkung des Zytostatikums konnte nur bei Bax, nicht jedoch bei Bcl-2 bzw. dem Qotienten aus Bcl-2 zu Bax beobachtet werden.

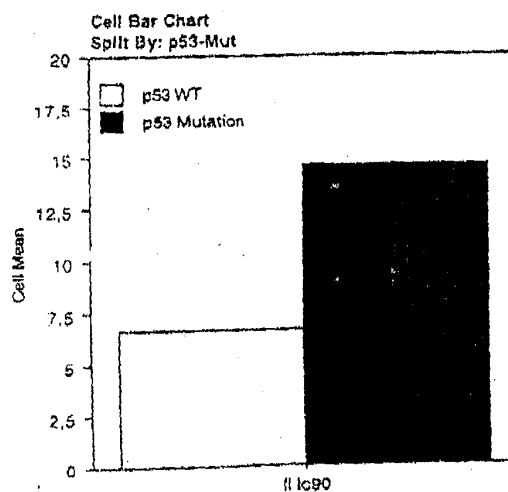


**Abbildung 3:** Verminderte Zytostatika-Sensitivität (Balkenhöhe entspricht Dosis in µg/ml Zytostatikum) bei p53-mutierten im Vergleich zu p53 Wildtyp CLL-Patienten. P53 Mutationen wurden mittels SSCP-PCR für die Exons 5 bis 8 bestimmt.

**A.** Effekt der p53-Mutation auf die Empfindlichkeit gegenüber Chlorambucil und Melphalan.



**B.** Effekt der p53-Mutation auf die Empfindlichkeit gegenüber Fludarabin.



**Anmelder:** Theragen  
Molekularmedizinische Informationssysteme AG  
Robert-Rössle-Str. 10  
D-13125 Berlin-Buch

**Erfinder:** Dr. Peter Daniel, Dr. Timo Hillebrand,  
Prof. Bernd Dörken, Dr. Peter Bendzko

**Verfahren zum Nachweis der Wirkung von unterschiedlichen Chemotherapeutika und/oder einer Strahlentherapie bei malignen Erkrankungen sowie Verfahren zur Auswahl wirkungsvoller therapeutischer Mittel zu deren Therapie**

#### **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis der Wirkung von unterschiedlichen Chemotherapeutika und/oder einer Strahlentherapie bei malignen Erkrankungen, wobei die Expressionsprofile von Tumor- und/oder Zellwachstum- und/oder Apoptose-assoziierten Genen und/oder die individuellen Unterschiede (Mutationen) in den Gen-Sequenzen bestimmt werden. Veränderungen im Zusammenhang mit Chemotherapeutika und/oder Strahlentherapie werden identifiziert, dargestellt und diagnostisch bewertet. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Auswahl wirkungsvoller therapeutischer Mittel zur Therapie maligner Erkrankungen. Es wird der Status von Zellzyklusgenen und/oder von Apoptose-assoziierten Targetgenen bzw. von deren Genprodukten in Körperflüssigkeiten, Zellen und/oder Organen bestimmt und hinsichtlich ihrer Wirkung auf entsprechende therapeutische Mittel diagnostisch ausgewertet. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Bax- und p53-Expression bzw. Mutationen untersucht und daraus abgeleitet Aussagen zur individualspezifischen Therapie-Entscheidung bei Leukämien und anderen malignen Erkrankungen bereitgestellt.